Ueber die Synthese und Eigenschaften von Aminosäure- und Peptidderivaten des p-Dimethylaminoanilins

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rüdiger Wißler
aus Berlin

D. 188

1961

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 81, App. 668

Ueber die Synthese und Eigenschaften von Aminosäure- und Peptidderivaten des p-Dimethylaminoanilins

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rüdiger Wißler
aus Berlin

D. 188

1. Referent: Prof. Dr. W. Broser
2. Referent: Prof. Dr. R. Riemschneider

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 1961
Tag der Promotion: - 9. Dez. 1961

Inhaltsangabe

Einleitung und Problemstellung	Seite	5
Durchführung	"	6
Darstellung von Aminosäure-p-dimethyl-aminoaniliden	"	6
Messung der Sauerstoffaufnahme der Aminosäure-p-dimethylaminoanilide in der Warburg-Apparatur	"	10
Verhalten von aminosäureacylierten p-Dimethylaminoaniliden gegenüber Oxydationsmitteln	"	15
Verhalten von halboxdierten Polypeptid-substituierten p-Dimethylaminoaniliden gegenüber Radikalen	"	20
Verseifung der mit Polyglutaminsäure-γ-ester substituierten Wurster'schen Basen	"	27
Weitere Versuche zur Herstellung von Polyaminosäuren mit radikalischen Gruppen	"	29
Zusammenfassung und Ergebnisse	"	33
Experimenteller Teil	"	35
Literaturverzeichnis	"	61

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0041

Einleitung und Problemstellung.

Fermente sind nach der im Jahre 1922 von R. WILLSTAETTER (1) aufgestellten "Trägertheorie" Symplexe aus einem makromolekularen Anteil und der eigentlichen Wirkgruppe. Von H. THEORELL (2) konnte 1934 erstmalig die Spaltung eines Ferments, des "gelben Atmungsferments", in die prosthetische Gruppe und einen Eiweißanteil so durchgeführt werden, daß das Ferment nach der Vereinigung wieder die volle Fermentwirksamkeit hatte. In der Folgezeit beschäftigte man sich hauptsächlich mit der Isolierung und Strukturaufklärung weiterer Cofermente. Einerseits hielt man lange Zeit den hochpolymeren Anteil für eine Art Schutzkolloid, das zwar für jedes Coferment mehr oder weniger spezifisch gebaut ist, jedoch an der katalytischen Wirkung des Fermentes unbeteiligt ist; andererseits gestatteten die bekannten Methoden des Peptidauf- und -abbaus noch nicht die Bearbeitung komplizierter Eiweißstoffe.

Von W. LAUTSCH und Mitarbeitern (3,4,5,6) wurde besonders das Gebiet der sauerstoffübertragenden Fermente durch Synthese von Modellsubstanzen untersucht. Es wurde die besondere Stellung der Polypeptide als Trägeranteil erkannt (7). Weiter wurde gefunden, daß reine Polypeptide die Autoxydation von Substraten, insbesondere p-Phenylendiamin, zu hemmen vermögen (8,9).

Es war daher interessant, Verbindungen zu synthetisieren, bei denen der Peptidanteil homoopolar mit dem Substrat verbunden ist. Es sollte untersucht werden, welche Eigenschaften, unter besonderer Berücksichtigung der O_2-Aufnahme, diese Substanzen besitzen.

Durchführung.

Darstellung von Aminosäure-p-dimethylamidoaniliden.

Als Substratsubstanzen wurden Verbindungen folgender Konstitution $(CH_3)_2N\text{-}C_6H_4\text{-}NH\text{-}CO\text{-}CH(NR'R'')\text{-}R$ aus p-Dimethylaminoanilin und Aminosäuren hergestellt. Dazu wurden N-geschützt Aminosäuren entweder über den Aethylester, das Hydrazid und das Azid nach B.F. ERLANGER und E. BRAND (10) oder direkt über das gemischte Anhydrid des Kohlensäuremonoäthylesters, dargestellt durch Umsetzung des Triäthylammoniumsalzes mit Chlorkohlensäureäthylester nach R.A. BOISSONNAS (11), mit p-Dimethylaminoanilin zur Reaktion gebracht. Als Schutzgruppe wurde nach M. BERGMANN (12) der Carbobenzoxyrest verwendet, der durch Umsetzen der Aminosäure mit Carbobenzoxychlorid, das aus Benzylalkohol und

Phosgen in Toluollösung erhältlich ist, eingeführt wird. Die Entfernung der Schutzgruppe wird nach D. BEN ISHAI (13) durch 40 minütiges Einwirken von 4 n HBr in absolutem Eisessig oder durch 48 stündiges Stehen mit 2 n HCl in Ameisensäure erreicht. Die N.N-disubstituierten Aminosäuren wie Piperidinoessigsäure, Morpholinoessigsäure, N.N-Diphenylaminoessigsäure und Carbazoloessigsäure werden besser direkt über das gemischte Anhydrid zur Reaktion gebracht. Die Azidmethode empfiehlt sich hierbei nicht, einerseits, da das Morpholinoessigsäureazid und das Piperidinoessigsäureazid, bedingt durch die basischen und hydrophilen Eigenschaften der Aminogruppe, nur schlecht aus der wäßrigen Phase in eine organische Phase überführbar sind, andererseits, da beim Diphenylaminoessigsäurehydrazid und beim Carbazoloessigsäurehydrazid beim Einwirken von salpetriger Säure neben der Azidbildung als Konkurrenzreaktion eine Nitrosierung der aromatischen Kerne, wahrscheinlich in p-Stellung, eintritt. Außerdem macht sich, wie auch bei den N-carbobenzoxygeschützten Aminosäuren, die bei der Reaktion freiwerdende Stickstoffwasserstoffsäure störend bemerkbar, indem sie die p-Dimethylaminoanilidgruppe in ungewünschter Weise oxydiert. Auch ein Zusatz von Reduktionsmitteln, wie z.B. Ascorbinsäure, kann nicht verhindern, daß das Reaktionsprodukt unrein anfällt. Isoliert wurden die Aminosäure-p-dimethylaminoanilide teils in freier Form (Piperidino-, Morpholino-, Diphenyl-

Tabelle 1.

Aminosäure-p-dimethylaminoanilid	M	F.	umkristallisiert aus
Glycin-, 2 HCl	266,18	245° unter Zers.	Wasser/Alkohol/Aceton
2 HBr	355,10	187° Sintern	Wasser/Alkohol/Aceton
Sarkosin-, 2 HBr	369,13	240° Sintern 246° Zers.	Methanol
DL-Phenylalanin-, 2 HCl	356,31	252° unter Zers.	Methanol
2 HBr	445,23	188°	Methanol
D-Phenylalanin-, 2 HBr	445,23	231-33° Zers.	Alkohol/Aether
L-Tyrosin-, 2 HCl	372,31	163° Zers.	Alkohol/Aether
2 HBr	461,23	161° Zers.	Wasser/Alkohol/Aceton
L-Cystin-di-, 4 HBr	800,37	240°	Wasser/Aceton
Morpholinoessigsäure-,	263,34	119,5°	Ligroin
2 HCl	336,30	168-170°	Alkohol/Petroläther
Piperidinoessigsäure-,	261,38	101°	Ligroin
2 HCl	334,29	204-206°	Alkohol/Petroläther
Diphenylaminoessigsäure-,	345,45	197-198°	Ligroin
1 HCl	381,91	193° Sintern 223,5° Zers.	Alkohol
Carbazoloessigsäure-,	343,43	289° unter Zers.	Xylol
1 HCl	379,89	240° Sintern 246° Zers.	Alkohol

amino- und Carbazolo-p-dimethylaminoanilid), teils in Form ihrer Hydrochloride bzw. Hydrobromide.

In Tabelle 1 sind die dargestellten Verbindungen zusammengefaßt.

Außerdem wurden die nachstehend in Tabelle 2 aufgeführten Carbobenzoxyverbindungen dargestellt, deren Decarboxylierungsprodukte, wahrscheinlich infolge teilweiser Abspaltung des p-Dimethylaminoanilin-Restes nicht kristallin und nicht analysenrein erhalten werden konnten.

Tabelle 2

N-Carbobenzoxy-aminosäure- bzw. peptid-p-dimethylaminoanilid	M	F.
-L-glutaminsäure-γ-benzylester-	489,58	174° unter Rotfärb.
-L-glutaminsäure-γ-methylester-	413,48	181°
-DL-norleucin-	383,50	136-137°
-glycylglycin-	384,44	174°
-glycyl-DL-alanin-	398,47	178-180°
-DL-alanylglycin-	398,47	180,5°
-DL-alanylalanin-	412,50	240,5°
-DL-alanylglycylglycin-	455,52	169°

Beim Arbeiten mit den aminosäure- bzw. peptidsubstituierten p-Dimethylaminoanilinen ist darauf zu achten, daß die Substanzen nicht mit der Haut in Berührung kommen, da es, besonders bei den carbobenzoxylierten Verbindungen, zu schweren, mehrere Wochen andauernden, verbrennungsartigen Veränderungen führen kann.

Messung der Sauerstoffaufnahme der Aminosäure-p-dimethylaminoanilide in der Warburg-Apparatur.

Die von O. WARBURG (14) eingeführte Methode erlaubt es, mengenmäßig geringe Gasumsetzungen quantitativ zu verfolgen. In einem mit einem Manometer versehenen Reaktionskolben wird der Reaktionsablauf an der Druckänderung der Gasphase verfolgt.

Die Auswertung geschieht nach der Formel:

$$x = h \frac{(V_G \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha)}{P_o}$$

x = Verbrauchtes Gasvolumen in mm^3 unter Normalbedingungen

h = Druckänderung des Gases bei konstantem Volumen, ausgedrückt in mm Sperrflüssigkeit

V_G = Volumen des Gasraumes

T = Meßtemperatur in °K

V_F = Volumen der Flüssigkeit

α = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient

P_o = Normaldruck, ausgedrückt in mm Sperrflüssigkeit

Das Glied $V_F \cdot \alpha$ kann wegen seiner Kleinheit vernachlässigt werden, die Formel vereinfacht sich daher:

$$x = h \frac{V_G \cdot 273}{T \cdot P_o}$$

Die Temperatur wurde in einem Thermostaten auf 23° C = 296° K eingestellt. In jedes Meßgefäß wurden 10^{-4} mol Substanz eingewogen und mit 5 ml Pufferlösung aufgefüllt. Diphenylamino- und Carbazoloessigsäure-p-dimethylaminoanilid konnten infolge ihrer völligen Unlöslichkeit im wäßrigen Medium nicht untersucht werden. Die Messungen wurden begonnen, nachdem die Gefäße nach 10 Minuten ohne Schüttelbewegung die Temperatur des Thermostaten angenommen hatten. Aeußere Luftdruckänderungen wurden mit Hilfe eines "Thermobarometers" festgestellt und bei den Meßergebnissen berücksichtigt. Die Ablesung der Druckänderungen wurden in Abständen von 10 Miruten durchgeführt. Die Messungen wurden einmal ohne den katalytischen Einfluß von Mesohämin-IX durchgeführt, um die Autoxydation der Verbindungen zu prüfen. Zur Messung der Oxydationsgeschwindigkeit in Gegenwart von Mesohämin-IX wurden 65 γ Mesohämin-IX - das entspricht der Menge von 5,5 γ Fe - in Form von 1 ml einer Lösung von 6,54 mg Mesohämin-IX in 5 ml Pyridin und 95 ml Wasser zu 10^{-4} mol in 5 ml Puffer gelöstem Substrat hinzugegeben. Als Vergleichssubstanzen wurden außerdem p-Phenylendiamin·2HCl sowie p-Acetylaminodimethylanilin vermessen. Als Puffer wurde Phosphatpuffer

verwendet, dessen p_H = 7,19 potentiometrisch gemessen wurde.

Substrat	Einwage
p-Phenylendiamin·2HCl	18,1 mg
p-Aminodimethylanilin·2HCl	20,9 mg
p-Acetylaminodimethylanilin	17,8 mg
Glycin-p-dimethylaminoanilid·2HCl	26,6 mg
Sarkosin-p-dimethylaminoanilid·2HBr	36,9 mg
Cystin-di-p-dimethylaminoanilid·4HBr	80,0 mg
DL-Phenylalanin-p-dimethyl-aminoanilid·2HBr	44,5 mg
Tyrosin-p-dimethylaminoanilid·2HCl	37,2 mg
Piperidinoessigsäure-p-dimethylaminoanilid	26,1 mg
Morpholinoessigsäure-p-dimethylaminoanilid	26,3 mg

Tabelle 3.

In den Kurven I-IV (Bild 1) ist der Sauerstoffverbrauch von p-Phenylendiamin (Kurve I), p-Dimethylaminoanilin (Kurve II) und p-Acetylaminodimethylanilin (Kurve III) in Gegenwart von Mesomin-IX und der O_2-Ver-

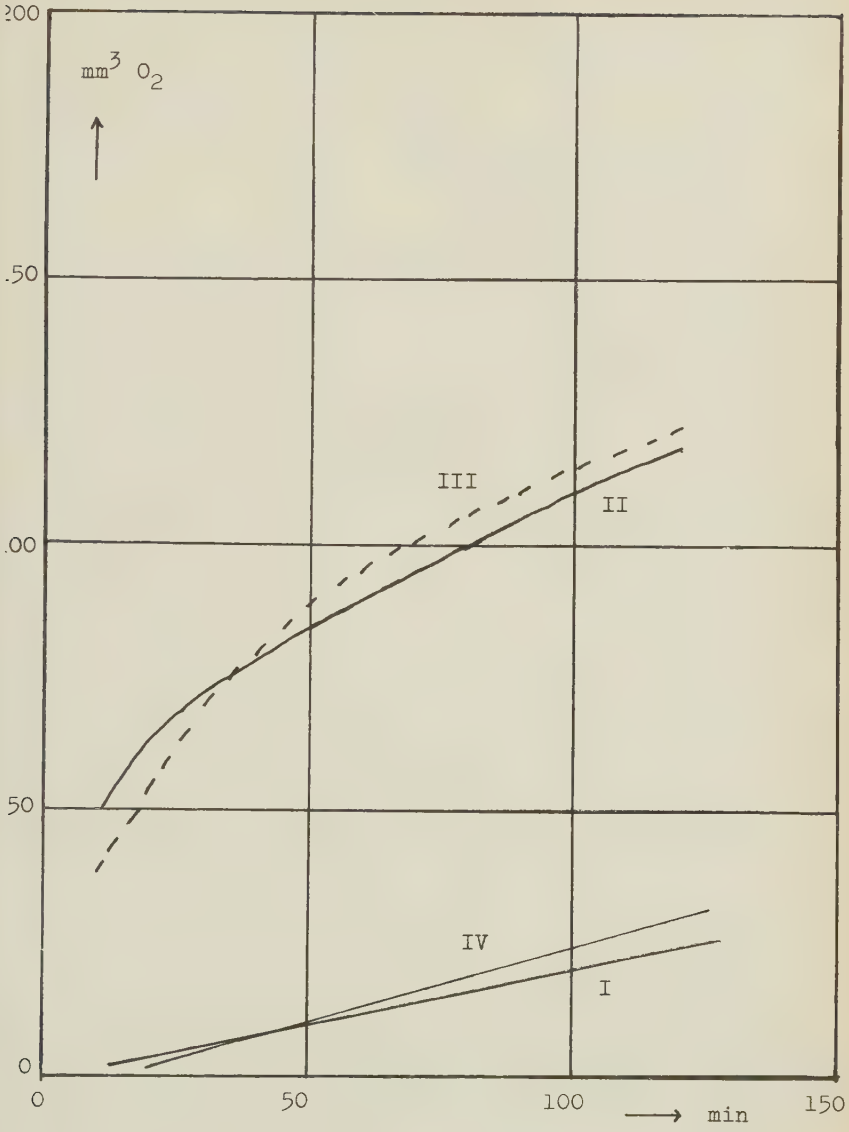

Bild 1

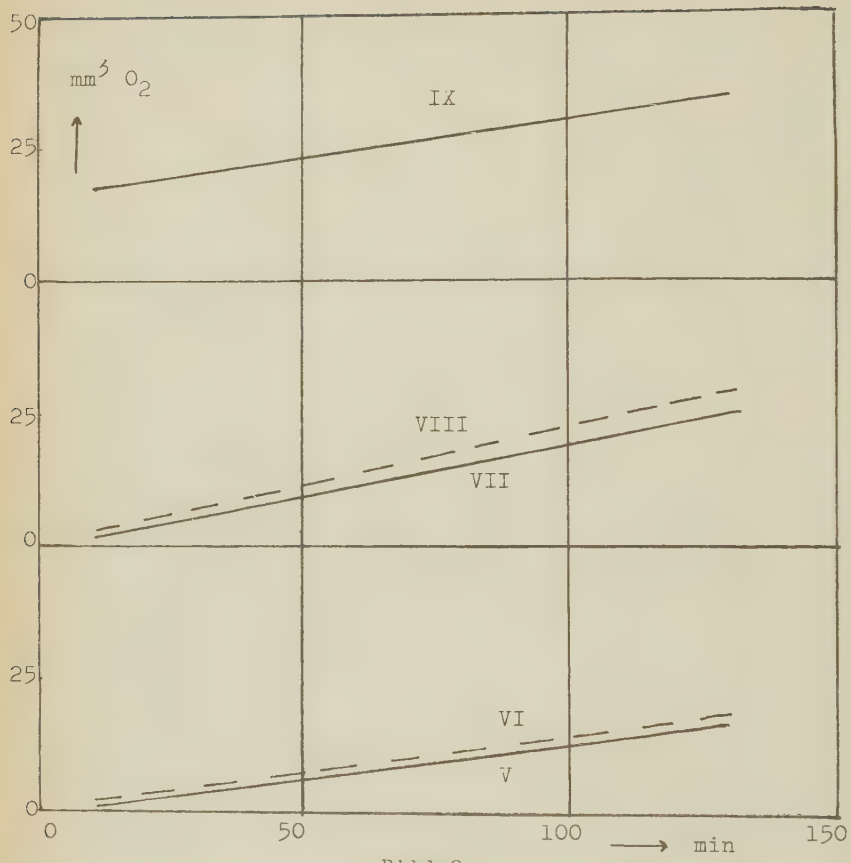

Bild 2

p_H-Abhängigkeit der Dehydrierung in Gegenwart von Mesohämin-IX

V p-Phenylendiamin in p_H 9,26
VI p-Phenylendiamin in p_H 6,96
VII p-Dimethylaminoanilin in p_H 9,26
VIII p-Dimethylaminoanilin in p_H 6,96
IX p-Acetylaminodimethylanilin in p_H 6,96

brauch von p-Dimethylaminoanilin (Kurve IV) ohne Mesohämin-IX-zusatz aufgezeichnet. Die Sauerstoffaufnahme von p-Phenylendiamin sowie von Acetylaminodimethylanilin in mesohäminfreien Puffer ist kaum meßbar. Erstaunlicherweise wird auf die aminosäureacylierten Wurster'schen Basen auch in Gegenwart von Mesohämin-IX überhaupt kein Sauerstoff übertragen. Um eine eventuelle p_H-Abhängigkeit der Oxydationsreaktion zu ermitteln, wurden die Versuche mit jeweils 10^{-5} Mol Substanz noch einmal in Pufferlösungen vom p_H 6,96 (Phosphat) sowie p_H 9,26 (Borat) in der Warburg-Apparatur geprüft. Hierbei ergab es sich, daß bei p-Phenylendiamin und p-Dimethylaminoanilin keine bemerkenswerten p_H-bedingten Unterschiede auftreten, wie aus den Kurven V-VIII in Bild 2 zu ersehen ist. p-Dimethylaminoacetanilid hingegen läßt bei p_H 9,26 keinen mesohämin-IX-katalysierten Sauerstoffverbrauch erkennen; den O_2-Verbrauch bei p_H 6,96 zeigt Kurve IX in Bild 2. Die Aminoacyl-p-dimethylaminoanilide zeigten auch hier keine Bereitschaft zur Sauerstoffaufnahme.

Verhalten von Aminosäure-acylierten p-Dimethylaminoaniliden gegenüber Oxydationsmitteln.

Wie durch die Oxydationsversuche in der Warburg-Apparatur gezeigt wurde, reagieren die aminosäureacylierten

p-Dimethylaminoanilide nicht mit Sauerstoff bei der Mesohämin-IX-Katalyse. Es war daher interessant, das Verhalten dieser Verbindungen bei Einwirken anderer Oxydationsmittel zu untersuchen. Da die Verbindungen, die sich vom p-Phenylendiamin ableiten, bei der Oxydation irreversible Veränderungen erleiden, ist die Bestimmung des Redoxpotentials nicht möglich. Es wurde daher mit Hilfe von Redox-Indikatoren (Zusammenstellung der Firma Merck) ermittelt, ob der r_H-Bereich, in dem das p-Dimethylaminoanilinderivat in den oxydierten Zustand übergeht, gegenüber der unsubstituierten Wurster'schen Base bzw. dem p-Phenylendiamin zu positiveren Werten verändert ist. Dabei wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen sowie p-Phenylendiamin·2HCl und p-Dimethylaminoanilin·2HCl als 0,1 molare Lösungen (p_H 7) verwendet. Jeweils 0,5 ccm der Lösung wurden mit 1-2 Tropfen der nach den Angaben im Küster-Thiel hergestellten Indikatorlösungen versetzt. Während die p-Phenylendiamin-Lösung bereits durch den Thionin-Indikator (E_o = + 0,06 Volt; r_H 15-17) oxydiert wurde, wurden die Lösungen des p-Dimethylaminoanilin sowie seiner acylierten Derivate durch Toluolylenblau (E_o = + 0,11 Volt; r_H 16-18) oxydiert. Es ergibt sich daraus die interessante Tatsache, daß das p-Phenylendiamin, obwohl es wesentlich leichter oxydiert werden kann, durch mesohämin-IX-katalysierten Sauerstoff wesentlich weniger angegriffen wird als die Wurster'sche Base. Weiterhin fällt auf, daß von den Dimethylaminoanilinderivaten, obwohl sie im gleichen r_H-Gebiet ($r_H \approx 17$) ihren

Umschlagsbereich haben, nur das unsubstituierte und das Acetylprodukt Sauerstoff aufnehmen.

Es wurde weiterhin das Verhalten der Aminosäure-p-dimethylaminoanilide bei der Oxydation mit elementarem Brom untersucht. Beabsichtigt war, analog der Reaktion von Wurster'scher Base mit Brom zum Wurster'schen Rot, die semichinoiden Radikalsalze zu isolieren, um ihr Verhalten studieren zu können. Jedoch zeigten bereits die vorbereitenden Versuche, daß sich die Aminosäure-p-dimethylaminoanilide anders verhalten als die Wurster'sche Base. Wurde zu einer Lösung des Aminosäure-p-dimethylaminoanilids Brom zugetropft, das mit dem gleichen Lösungsmittel verdünnt worden war, so bildete sich zwar an der Eintropfstelle eine kräftige Rotfärbung aus, die jedoch innerhalb weniger Sekunden fast völlig verblaßte. In konzentrierten organischen Lösungen läßt sich die Färbung teilweise bis zu einigen Minuten beobachten, jedoch nur dann, wenn die Aminogruppe der Aminosäure nicht acyliert ist. Bei N-Carbobenzoxyaminosäure-p-dimethylaminoaniliden tritt die Entfärbung wesentlich schneller ein, teilweise ist ihre Ausbildung kaum erkennbar. In 1 molaren wäßrigen Lösungen sind durch geringe Bromzugaben, die nur einige Prozent der Substanz in den Semichinonzustand überführen, die beständigsten Rotfärbungen erzielbar, die sich visuell nicht von Lösungen des Wurster'schen Rots unterscheiden.

Für die Aufnahme der Absorptionsspektren, siehe Bild 3, wurde p-Dimethylaminoanilindihydrochlorid in $5 \cdot 10^{-4}$ molarer

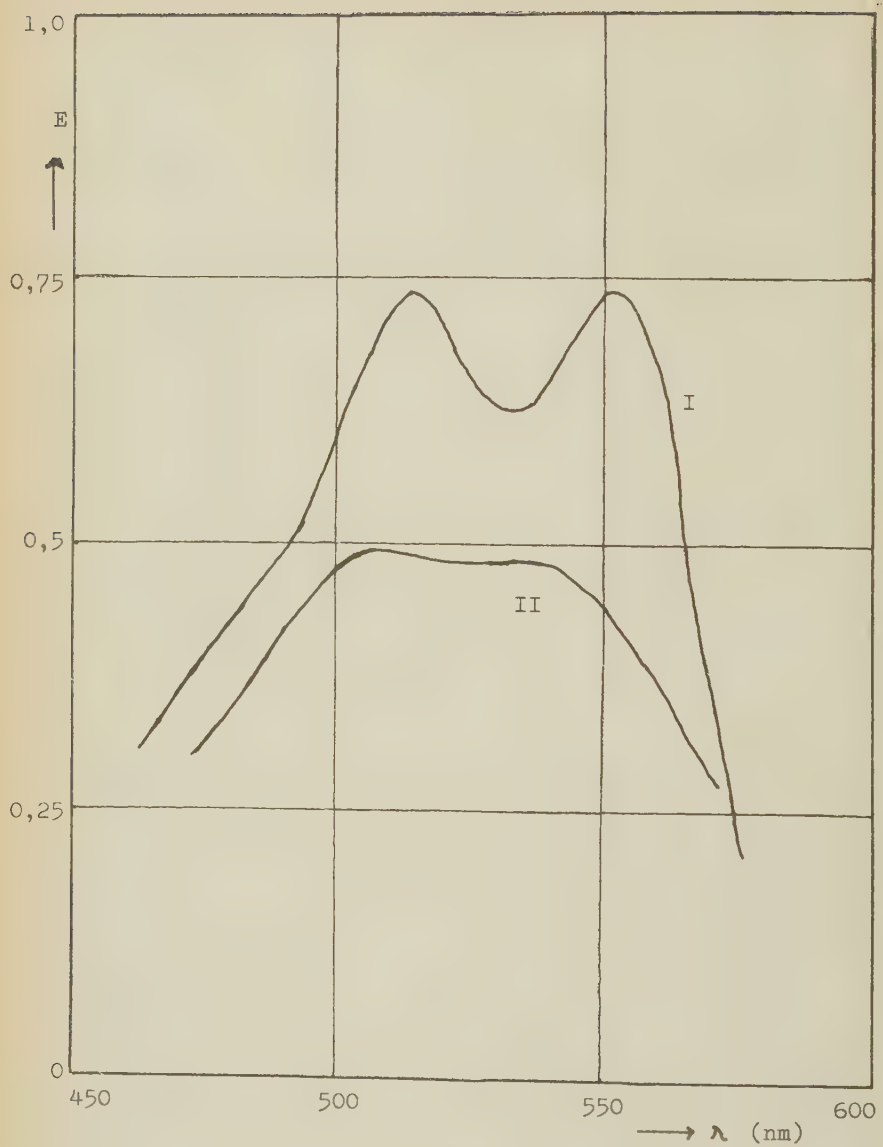

Bild 3

wäßriger Lösung zu 10% zum Wurster'schen Rot durch Bromzugabe oxydiert, so daß die Farbstoffkonzentration $5 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter beträgt. Kurve I zeigt das Spektrum des Wurster'schen Rot mit seinen beiden Maxima bei 514 nm und 551 nm. Um das Spektrum der Radikalverbindung von Glycin-p-dimethylaminoanilid aufnehmen zu können, wurde das Dihydrochlorid als 10^{-1} molare wäßrige Lösung zu 2% durch Bromzugabe oxydiert, so daß in diesem Fall die Radikalkonzentration theoretisch $2 \cdot 10^{-3}$ Mol/Liter beträgt. Das Spektrum zeigt Kurve II. Die Absorptionsspektren wurden unmittelbar nach der Oxydation mittels eines Beckman DK2 Spektralphotometers aufgenommen. Um beide Kurven vergleichbar darstellen zu können, wurde die gemessene Extinktion gegen die Wellenlänge aufgetragen, wobei zu beachten ist, daß die Extinktionskoeffizienten sich um den Faktor $2{,}5 \cdot 10^{2}$ unterscheiden. Man erkennt, daß die beiden Maxima des Wurster'schen Rots bei der entsprechenden Glycinverbindung - wie auch bei den übrigen aminosäureacylierten Verbindungen - nur noch schwach angedeutet sind. Eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen um einige nm kann angenommen werden.

Auch Versuche, für die Oxydation in organischen Lösungsmitteln statt Brom Benzoylperoxyd zu benutzen, führten zu gleichen Ergebnissen. Ebenso führte die Umsetzung mit Chlortetroxyd, das aus Silberperchlorat und Jod in Aether erhältlich ist, nicht zu beständigen Radikalsalzen, obwohl im Allgemeinen die Perchlorate von Amminiumverbindungen kristallin erhalten werden können.

Bei schneller Zugabe von in Eisessig gelöstem Brom zu einer konzentrierten Lösung von N-Carbobenzoxyphenylalanin-p-dimethylaminoanilid in Eisessig bei Zimmertemperatur unter Rühren wurde eine rötliche sirupöse Masse erhalten, die nach dem Abdekantieren des überstehenden Eisessigs und Trocknen im Vakuumexsikkator nach Benzylbromid roch. Durch Umkristallisieren aus Alkohol konnte eine Substanz erhalten werden, die auf Grund der Halogenanalyse dem Monohydrobromid des Carbobenzoxyphenylalanin-p-dimethylaminoanilids entsprach.

Verhalten von halboxydierten polypeptidsubstituierten p-Dimethylaminoaniliden gegenüber Radikalen.

Da die peptidacylierten Wurster'schen Basen eine wesentlich größere Unbeständigkeit zeigen als die freie Verbindung, wurde untersucht, ob die Peptidkette - besonders eine Polypeptidkette - durch Beeinflussung des Elektronensystems des Radikals eine Veränderung erfährt. Nach den Formulierungen von W. LAUTSCH (15) über den Mechanismus der Elektronenleitung in Peptiden hat man Verschiebungen jeweils eines Elektrons anzunehmen. Da das Wurster'sche Rot sich nun durch Abgabe eines Elektrons zum Chinondiimin oder durch Aufnahme eines Elektrons zum p-Phenylendiamin stabilisieren kann, war zu untersuchen, ob dieses Elektron von

der Peptidkette aufgenommen bzw. abgegeben wird. Die Peptidkette würde somit ein ungepaartes Elektron aufweisen (16); wenn diesem Elektron ein Ort größter Aufenthaltswahrscheinlichkeit zukäme, so müßte dieser Ort durch Umsetzung mit anderen Radikalen erkennbar sein, falls die Stabilisierung nicht schneller durch andere Möglichkeiten - Dimerisierung, Disproportionierung oder Reaktion mit dem Lösungsmittel - eintritt.

Die benötigten polypeptidacylierten Wurster'schen Basen wurden durch anionische Polymerisation der Aminosäure-N-carbonsäureanhydride hergestellt. Als Initiator wurde p-Dimethylaminoanilin verwendet. Als Lösungsmittel eignete sich gereinigtes und getrocknetes Benzol und Chloroform; bei Polymerisationsansätzen in Dioxan wurde ein größerer Anteil des Reaktionsproduktes durch Methanol ausgewaschen. Die N-Carbonsäureanhydride wurden durch Phosgenisieren der entsprechenden Aminosäuren in Dioxan bei Temperaturen zwischen 40 und 45° C nach der Methode von A.C. FARTHING und R.I. REYNOLD (17) hergestellt. Das p-Dimethylaminoanilin muß unmittelbar vor seiner Verwendung als Initiator destilliert und völlig farblos sein. Ist dies nicht der Fall, tritt bei der Initiator-Zugabe eine starke Grünfärbung der Polymerisationslösung auf, die sich nach beendeter Reaktion wieder etwas zurückbildet. Die gebildeten Polymeren fallen in diesem Falle bräunlich-grünlich an und können auch durch Umfällen oder Anwendung von Reduktionsmitteln nicht weiß erhalten werden.

Es wurden folgende Polyaminosäuren hergestellt:

Polyaminosäure	Verhältnis NCA : Initiator		
Poly-L-glutaminsäure-γ-benzylester	1 : 25	1 : 50	1 : 100
Poly-L-glutaminsäure-γ-methylester	1 : 25	1 : 50	1 : 100
Poly-DL-phenylalanin	1 : 25	1 : 50	1 : 100
Poly-S-benzyl-L-cystein		1 : 50	
Copolymeres aus Poly-L-glutaminsäure-γ-benzylester und S-Benzyl-L-cystein (5:1)		1 : 50	

Tabelle 4

Die erhaltenen Polypeptide wurden mit Petroläther ausgefällt, mehrmals mit Alkohol durchgewaschen und schließlich, wenn in der Waschflüssigkeit keine Wurster'sche Base mehr nachweisbar war, abgesaugt und getrocknet. Sie stellten weiße Pulver dar, die sich auch bei längerer Aufbewahrung nicht verfärben.

Zu 1%igen Lösungen des Polypeptids in Benzol bzw. Chloroform wurde eine sehr verdünnte Bromlösung zugetropft. Die Polymeren verhalten sich dabei analog den Monomeren, d.h., die sich ausbildende Rotfärbung begann sofort zu verblassen und zwar nach ca. 45 Sekunden war sie nicht mehr wahrnehmbar. Nach ca. 1 Minute - gemessen von der Bromzugabe - bildete sich eine Trübung aus; nach mehreren Stunden hatte sich ein Bodenkörper abgesetzt, der durch Abdekantieren des

Lösungsmittels isoliert werden konnte. Da sich bei Zugabe von HBr ein analoger Niederschlag bildet, handelt es sich wahrscheinlich um die Bildung des Hydrobromids der Polyaminosäure-p-dimethylaminoanilid.

Auf Grund der Zersetzlichkeit des p-Dimethylaminoanilidrestes, und da sich bei der Herstellung der Polymeren ein unbestimmter Anteil der Wurster'schen Base dem Einbau in das Polypeptid entzieht, ist es nicht möglich, die Konzentration der radikalisierbaren Kopfgruppe exakt zu bestimmen. Es konnten daher auch keine stöchiometrischen Umsetzungen durchgeführt werden. Die einzige Möglichkeit bestand darin, die Lösung des Polyaminosäure-p-dimethylaminoanilids mit einer frisch eingestellten Bromlösung zu titrieren, bis sich ein Ueberschuß an Brom durch seine Färbung, die in Gegenwart des ausfallenden Polymeren gut erkennbar ist, selbst anzeigt. Die Hälfte der verbrauchten Brommenge wäre dann theoretisch für die Oxydation zum Radikal erforderlich. Läßt man in O_2-freier Atmosphäre zu einer Lösung des Poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester]-p-dimethylaminoanilid unmittelbar nach der Bromzugabe eine Triphenylmethyllösung zutropfen, so ist die Lösung momentan entfärbt. Durch Ausfällen der Polymeren mit Methanol, Filtrieren, Eindampfen des Filtrats und Erhitzen des Rückstandes mit Thionylchlorid läßt sich das zugesetzte Trityl als Triphenylchlormethan zurückgewinnen. Das Polymere gibt mit Brom erneut eine unbeständige Rotfärbung. Da sich geringe Umsetzungen an Polymeren der üblichen chemischen

Identifizierung entziehen, wurde der Versuch mit radioaktiv markiertem Triphenylmethylradikalen wiederholt. Das an der Carbinolgruppe mit ^{14}C versehene Triphenylcarbinol wurde dazu mit gereinigtem $SOCl_2$ in das Chlorid übergeführt, das aus Benzol unter Zusatz von Petroläther in Gegenwart von etwas Acetylchlorid umkristallisiert wurde. Das so erhaltene Chlorid wurde in üblicher Weise durch Schütteln mit Zinkstaub in reinem Benzol in eine das Radikal enthaltende Lösung umgewandelt.

In Vorversuchen wurde festgestellt, ob Polyglutaminsäure-γ-benzylester-Lösungen ohne radikalische Kopfgruppe Triphenylmethyl adsorbieren. Dies ist nicht der Fall. Wenn jedoch Sauerstoff nicht restlos ausgeschlossen ist, wird das gebildete Bis-[triphenylmethyl]-peroxyd beim Ausfällen des Polypeptids adsorbiert und täuscht durch die Erhöhung der Impulse bei der Messung der Radioaktivität eine Verbindung mit dem Radikal vor. Es wurde durch nochmaliges Lösen des Polymeren, längeres Abzentrifugieren des Bis-[triphenylmethyl]-peroxyds, Dekantieren und erneutes Ausfällen ein Polypeptid ohne Radioaktivität erhalten, so daß auch die Möglichkeit einer Bindung des Triphenylmethyl an das Peptid über eine Aether- oder Peroxyd-Brücke ausscheidet. Interessant war die dabei gemachte Beobachtung, daß eine Poly-DL-phenylalanin-enthaltende Lösung von Triphenylmethyl-Radikalen in Chloroform beim Stehen oder beim Schütteln an der Luft schneller entfärbt wird als eine

peptidfreie Lösung. Im Gegensatz zur Oxydationshemmung von p-Phenylendiamin durch Polypeptide muß also bei Trityl-Radikalen eine positive Katalyse auftreten.

Zum eigentlichen Versuch wurde nun eine benzolische Lösung von Poly-L-glutaminsäure-γ-benzylester-p-dimethylaminoanilid unter Stickstoffatmosphäre mit 1/5 der theoretisch zur vollkommenen Radikalbildung notwendigen Menge benzolischer Bromlösung versetzt und die eingetretene Färbung sofort durch Zugabe von Triphenylmethyl-Lösung vernichtet. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis auf erneute Bromzugabe keine Rotfärbung mehr auftrat, d.h., bis infolge irreversibler Zersetzungsprozesse keine Wurster'sche Base mehr im Peptid enthalten war. Durch Fällung und gründliches Auswaschen des Polypeptids mit Methanol wurde ein Produkt erhalten, das gegenüber der Nullwertsbestimmung keine erhöhte Impulszahl hatte, also keine Triphenylradikale addiert hatte.

Weiterhin wurde bei dem biologisch interessanteren System Mesohämichromogen-IX-polypeptid/Mesohämochromogen-IX-Polypeptid untersucht, ob eine Radikalbeeinflussung stattfindet. Dazu wurden zwei Typen von Fermentmodellen untersucht. Im ersten Typ wurde die Polypeptidgruppe durch eine chemische Hauptvalenz an das Mesohämin gebunden, indem die Polykondensation der Aminosäure-N-carbonsäureanhydride durch Mesoporphyrin-IX-dihydrazid initiiert wurde und in das erhaltene Polymere durch Reaktion mit Eisen(II)-

acetat in Eisessig in Gegenwart von NaCl das zentrale Eisenatom eingeführt wurde. Im zweiten Typ wurde die Polykondensation durch α-Aminopyridin ausgelöst und die erhaltenen polypeptidsubstituierten Pyridine als Chromogenbildner verwendet. Die Messungen wurden in Dimethylformamid vorgenommen.

Gemessen wurde die Lage sowie die Extinktion des Maximums des Tritylspektrums bei 515 nm, indem - bis auf den Tritylzusatz - die Meß- und die Vergleichsküvette die gleichen Lösungen enthielten. Zuerst wurde geprüft, ob das Tritylspektrum durch zugesetzte Polypeptide eine Aenderung erkennen läßt. Da das nicht der Fall war, wurden entsprechende Messungen mit den Hämin-Polypeptiden durchgeführt. Auch hierbei konnte keine Aenderung des Tritylspektrums festgestellt werden. Es ist also mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß keine Wechselwirkung zwischen Trityl-Radikalen und mesohämingebundenen Polypeptiden eintritt. Durch Umsetzung mit ^{14}C-markiertem Triphenylmethyl wurde zusätzlich der Beweis gebracht, daß eine Adduktbildung nicht stattfindet.

Verseifung der mit Polyglutaminsäure-γ-ester substituierten Wurster'schen Basen.

Durch Hydrolyse von Poly-L-glutaminsäure-γ-benzylester bzw. γ-methylester-p-dimethylaminoanilid werden die freien Polysäuren erhalten.

Die bekannten Methoden hierfür sind:

Die Abspaltung der Benzylgruppen durch 4 n HBr in Eisessig (13).
Die Abspaltung der Benzylgruppen mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak (18).
Die Ueberführung des Benzylesters oder Methylesters in das Polyhydrazid und dessen Hydrolyse in konzentrierter wäßriger Salzsäure (19).
Das Verseifen des Methylesters in alkalischer Kupferhydroxydlösung (20).
Die katalytische Abhydrierung der Benzylgruppen mit Wasserstoff führt infolge des Ausfallens der entstehenden Polysäure, die den Katalysator umschließt, nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Beim Behandeln von Polyglutaminsäure-γ-benzylester-p-dimethylaminoanilid muß dafür Sorge getragen werden, daß sich kein freies Brom bildet. Dafür arbeitet man am besten in einer Stickstoffatmosphäre unter weitgehendem Lichtausschluß. Die Polysäure wird durch Fällen mit peroxydfreiem Aether und Abdekantieren der überstehenden klaren Lösung isoliert. Das Produkt wird solange mit Aether gewaschen,

bis kein Geruch nach Benzylbromid mehr wahrnehmbar ist. Anschließend wird die Polyglutaminsäure durch Lösen in Sodalösung, Filtrieren und Ansäuern des Filtrats rein erhalten.

Die Ueberführung der Polymethylester in die Polysäuren geschieht ebenfalls zweckmäßig in einer Stickstoffatmosphäre, um die Oxydation der Kopfgruppe zu vermeiden.

Die Abspaltung der Benzylgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak war besonders für die Copolymeren aus S-Benzylcystein und Glutaminsäure-γ-benzylester von Interesse, da hierbei in einem Schritt sowohl die Estergruppe wie die Schwefelschutzgruppe entfernt werden kann. Jedoch wird bei der Reaktion gleichzeitig der p-Dimethylaminoanilid-Rest abgespalten. Das nach der Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erhaltene Polymere gab keine Farbreaktion mit Brom mehr. Bemerkenswert ist weiterhin die Beobachtung, daß die ammoniakalische Reaktionslösung nach dem Verschwinden der blauen, durch das Natrium bedingten Fabe quittengelb gefärbt ist, was bei der Benzylabspaltung aus unsubstituiertem Polyglutaminsäure-γ-benzylester nicht der Fall ist.

Während die Polyglutaminsäure-γ-methylester- bzw. γ-benzylester-p-dimethylaminoanilide gegen Sauerstoff beständig sind, erweisen sich die unveresterten Polysäuren, besonders in gelöstem Zustand, als autoxydabel. Bei der Oxydation wird die p-Dimethylaminoanilin-Gruppe abgespalten. Dies geht besonders aus folgendem Versuch hervor:

Die durch Entbenzylierung mit HBr/Eisessig aus dem Polybenzylester teilweise erhaltenen niederpolymeren Polyglutaminsäure-p-dimethylaminoanilide sind in Methanol löslich; beim Stehen an der Luft nimmt die Lösung eine rosa Färbung an, die nach ca. 12 Stunden nach gelb umgeschlagen ist; dabei hat sich die Polysäure am Boden abgesetzt; sie enthält keine p-Dimethylaminoanilid-Gruppen mehr.

Weitere Versuche zur Herstellung von Polyaminosäuren mit radikalischen Gruppen.

Bei den Befunden über die Unbeständigkeit des Semichinonzustandes der Aminosäure-p-dimethylaminoanilide taucht die Frage auf, ob es sich allgemein bei Peptidradikalen um unbeständige Verbindungen handelt, d.h., ob der Peptidanteil die Ausbildung des Radikalzustandes erschwert oder unmöglich macht. Daher wurden zwei weitere Typen von eventuell radikalisierbaren Peptiden hergestellt.

Durch Initiierung der NCA-Polykondensation mit asymmetrischem Diphenylhydrazin lassen sich N'-Polyaminosäure-N.N-diphenylhydrazine herstellen. Analog den N.N-Diphenyl-N'-acylhydrazinen sollten sich diese Substanzen zu den ent-

sprechenden Hydrazylen nach St. GOLDSCHMIDT (21) oxydieren lassen. Die Polypeptide wurden dazu in Chloroform - bei Poly-DL-phenylalanin - oder in Benzol - bei Poly-L-glutaminsäure-γ-benzylester - mit aktivem Bleidioxyd und Na_2SO_4 1 Stunde geschüttelt. Dann wurde vom Bleioxyd abfiltriert und der Filterrückstand mehrmals gewaschen. Aus den vereinigten Filtraten läßt sich durch Petroläther zusatz das Polymere ausfällen, das nach mehrmaligem Umfällen und Trocknen als graues Pulver anfällt. Die Ausbeute beträgt ungefähr 50% der eingesetzten Menge. Die Löslichkeit der Substanz ist wesentlich geringer geworden. Im getrockneten Bleidioxyd-Schlamm ist sehr viel organische Substanz enthalten, wie durch die Glühprobe festgestellt wurde. Andere Ansätze mit verlängerten Schüttelzeiten zeigten dasselbe Verhalten. Bei einem Probeansatz mit unsubstituierten Polyaminosäuren konnte das Polymere als weißes Pulver in 95%iger Ausbeute zurückerhalten werden. Es muß also angenommen werden, daß die Oxydation der Hydrazingruppe zu Veränderungen des Polymeren unter Kettenverlängerung oder Kettenvernetzung führt.

Um keinen Bleioxydrückstand zu erhalten, der Polypeptidanteile adsorbieren kann, wurde versucht, das PbO_2 durch Bleitetraacetat oder Ammoniumpersulfat zu ersetzen. Jedoch reagiert das Bleitetraacetat auch mit unsubstituierten Polyaminosäuren unter Verfärbung und Bildung viskoser Oele; das Ammoniumpersulfat hingegen reagiert über-

haupt nicht mit N.N-Diphenyl-N'-aminosäurehydrazinen, wie bei einem Vergleichsversuch mit Carbobenzoxyglycin-N'.N'-diphenylhydrazid festgestellt wurde.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Polyaminosäuren durch Initiierung der Aminosäure-N-carbonsäureanhydrid-Kondensation durch Mandelsäurehydrazid hergestellt. Es ist bekannt, daß beim Zusammengeben von Benzil und Benzoin in alkalisch-alkoholischem Medium eine rote Lösung entsteht, in der ein Gleichgewicht zwischen dem radikalischen Ketyl und dem dimeren Pinakonat herrscht (22). Ersetzt man das Benzoin durch Mandelsäurehydrazid, so entsteht ebenfalls eine gefärbte Lösung, die beim Schütteln mit Luft auch das Schmidlin'sche Phänomen zeigt. Allerdings sind diese Lösungen auch bei Sauerstoffausschluß nur beschränkte Zeit haltbar, wahrscheinlich wegen der Hydrolyse des Mandelsäurehydrazids. Es zeigte sich jedoch, daß derartige Polymere in Dimethylformamid-Lösungen mit Benzil auf Zusatz von alkoholischer Kalilauge keine Farbvertiefung zeigen.

Außerdem wurde untersucht, ob man durch radikalische Polymerisation von Aminosäure-N-carbonsäureanhydriden oder durch anionische Polymerisation in Gegenwart von Radikalen zu radikalhaltigen Polypeptiden gelangen kann. Die Versuche wurden folgendermaßen durchgeführt:

In 15 ml gereinigtem und über Natriumdraht getrocknetem Benzol wurden jeweils 2,63 g (= 10^{-2} mol) L-Glutaminsäure-γ-benzylester-N-carbonsäureanhydrid gelöst. Eine für alle

Versuche gleiche Initiatorlösung wurde durch Mischen von 0,8 ml Methanol und 99,2 ml Benzol hergestellt. 1 ml dieser Lösung entspricht einem Molverhältnis Initiator/NCA = 1 : 50. Es wurde jeweils ein Gefäß mit 10^{-3} Mol Radikal sowie ein Gefäß mit 10^{-3} Mol Radikal und 1 ml Initiatorlösung angesetzt; dazu wurde als Blindversuch ein Gefäß ohne Initiatorlösung und ohne Radikalzusatz sowie ein Gefäß mit Initiatorlösung verwendet. Sämtliche Gefäße wurden mit Stickstoff durchspült, um Sauerstoffeinflüsse ausschließen zu können. Als Radikal bzw. Radikalbildner wurden Trityl, 2.4.6-Tri-tert.-butylphenoxyl, Diphenylpikrylhydrazyl, Tetraphenylhydrazin und Azoisobuttersäuredinitril zugesetzt. Als Polymerisationstemperatur wurden 60° C gewählt. Es wurde gefunden, daß bei den initiatorfreien Lösungen nach 24 Stunden keine Polymerisation stattgefunden hat; das NCA ließ sich wieder zurückgewinnen. Bei den radikal- und initiatorhaltigen Ansätzen war keine Beeinflussung durch den Radikalzusatz gegenüber dem Blindwert feststellbar; alle anfallenden Polymeren hatten die gleiche Beschaffenheit.

Aus den Untersuchungen ergab sich, daß unter den beschriebenen Bedingungen eine radikalische Polymerisation der Aminosäure-N-carbonsäureanhydride nicht auftritt.

Zusammenfassung und Ergebnisse.

Durch Untersuchungen der Sauerstoffabsorption in der Warburg-Apparatur wurde gezeigt, daß p-Dimethylaminoanilin durch Acylierung mit Aminosäuren seine Fähigkeit, Sauerstoff durch Mesohämin-IX-Katalyse aufzunehmen, verliert. Durch Reaktion mit Redox-Katalysatoren wurde festgestellt, daß die Ursache für dieses Verhalten nicht eine Aenderung des Redoxpotentials sein kann. Bei der Reaktion der Aminosäure-acylierten p-Dimethylaminoanilide mit Brom konnte die Ausbildung des radikalischen Semichinonzustandes nur intermediär festgestellt werden. Da für die Unbeständigkeit des Radikalsalzes ein Elektronentransport über die Peptidkette angenommen werden kann, wurde versucht, ob sich die in der Peptidkette - besonders in einer Polypeptidkette - bildenden radikalischen Strukturen nachweisen lassen. Dazu wurden Umsetzungen mit anderen Radikalen vorgenommen. Besonders wurde versucht, ob sich durch die Einwirkung von ^{14}C-markiertem Triphenylmethyl radioaktive Addukte nachweisen lassen. Jedoch zeigten die nach der Tritylbehandlung isolierten Peptide keine Radioaktivität; auf eine irreversible Adduktbildung konnte also nicht geschlossen werden.

Weiterhin wurde mit zwei anderen Radikaltypen untersucht, ob die Peptidkette nur im Spezialfall der Wurster'schen Radikalsalze eine Schwächung des Radikalzustandes bewirkt. Dafür wurden mit Diphenylhydrazin substitu-

ierte Polypeptide hergestellt. Nach der Dehydrierung dieser Polypeptide konnten jedoch keine Hydrazyle isoliert werden.

Durch Initiierung von Aminosäure-N-carbonsäureanhydriden mit Mandelsäurehydrazid wurden Polymere erhalten, deren Kopfgruppe zur Endiol-Bildung befähigt ist. Durch Umsetzung mit Benzil in alkalischem Medium konnten entgegen dem Verhalten der Initiatorsubstanz selbst keine Farbverschiebung wahrgenommen werden.

Aus den in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen ergab sich, daß Peptide die Bildung eines mit ihnen durch chemische Bindung verknüpften Radikals erschweren oder die Umwandlung der Radikalgruppe in ein nichtradikalisches System begünstigen. Dabei eventuell intermediär auftretende Radikalstellen konnten in den Polypeptiden aus DL-Phenylalanin bzw. L-Glutaminsäureestern nicht nachgewiesen werden.

Experimenteller Teil

p-Dimethylaminoanilin (Wurster'sche Base) (23)

$C_8H_{12}N_2$ M = 136,19

Dihydrochlorid

$C_8H_{14}Cl_2N_2$ M = 209,12 F. 198°

N-Acetylderivat

$C_{10}H_{14}N_2O$ M = 178,23 F. 130°

N-Carbobenzoxyaminosäuren

Nach M. BERGMANN und L. ZERVAS (12) wurden durch Reaktion der Aminosäuren mit Chlorameisensäurebenzylester in wäßrig-alkalischem Medium folgende N-Carbobenzoxyaminosäuren dargestellt:

N-Carbobenzoxyglycin

$C_{10}H_{11}NO_4$ M = 209,20 F. 120°

N-Carbobenzoxysarkosin

$C_{11}H_{13}NO_4$ M = 223,22 F. 57-58°

N-Carbobenzoxy-DL-phenylalanin

$C_{17}H_{17}NO_4$ M = 299,31 F. 103°

N-Carbobenzoxy-D-phenylalanin

$C_{17}H_{17}NO_4$ M = 299,31 F. 126-128°

N-Carbobenzoxy-L-tyrosin

$C_{17}H_{17}NO_5$ M = 315,31 F. 101°

N.N'-Bis-carbobenzoxy-L-cystin

$C_{22}H_{24}N_2O_8S_2$ M = 508,55 F. 123°

N-Carbobenzoxy-DL-norleucin (24)

$C_{14}H_{19}NO_4$ M = 265,30 F. 105-106°

N-Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-benzylester (25)

$C_{20}H_{21}NO_6$ M = 371,38 F. 76-78°

N-Carbobenzoxy-L-glutaminsäure-γ-methylester (25)

$C_{14}H_{17}NO_6$ M = 295,28 F. 72-73°

N-Carbobenzoxyaminosäure-p-dimethylaminoanilide

analog der Anhydridmethode nach R.A. BOISSONNAS (11).

Die N-Carbobenzoxyaminosäure wird in reinem Essigester gelöst und mit der äquivalenten Menge Triäthylamin versetzt. Die Lösung wird im Eis-Kochsalz-Bad auf -10° C gekühlt. Dazu läßt man unter Rühren die äquivalente Menge Chlorameisensäureäthylester, der mit dem gleichen Volumen Essigester verdünnt ist, zutropfen. Die Temperatur soll dabei nicht über -5° C steigen. Nach beendeter Zugabe wird eine Stunde weitergerührt. Dann wird die äquivalente Menge p-Dimethylaminoanilin, die in Essigester gelöst ist, langsam zugegeben. Nach weiterem 2 stündigen Rühren im Kältebad läßt man das Reaktionsgemisch Zimmertemperatur annehmen. Nach mehrstündigem Stehen, am besten über Nacht, wird die Lösung mit Wasser ausgeschüttelt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Der Essigester wird abdestilliert und der Rückstand umkristallisiert. Die Ausbeute hängt entscheidend von der Reinheit des p-Dimethylaminoanilins ab.

N-Carbobenzoxyglycin-p-dimethylaminoanilid

$C_{18}H_{21}N_3O_3$ M = 327,39

Ansatz: 41,8 g N-Carbobenzoxyglycin
20,2 g Triäthylamin
21,6 g Chlorkohlensäureäthylester
27,2 g p-Dimethylaminoanilin
1,5 l Essigester

Das Produkt wird aus Aethanol umkristallisiert und fällt in weißen Nadeln an.

Ausbeute: 44 g = 67,4% d.Th.

F. 144–145,5°

N-Carbobenzoxysarkosin-p-dimethylaminoanilid

$C_{19}H_{23}N_3O_3$ M = 341,41

Ansatz: 11,2 g N-Carbobenzoxysarkosin
5,0 g Triäthylamin
5,4 g Chlorameisensäureäthylester
6,8 g p-Dimethylaminoanilin
800 ml Essigester

Das Produkt wird aus Aethanol umkristallisiert und fällt in weißen Prismen an.

Ausbeute: 12 g = 70,5% d.Th.

F. 125,4°

N-Carbobenzoxy-DL-phenylalanin-p-dimethylaminoanilid

$C_{25}H_{27}N_3O_3$ M = 417,52

Ansatz: 29,9 g N-Carbobenzoxy-DL-phenylalanin
10,1 g Triäthylamin
10,8 g Chlorkohlensäureäthylester
13,6 g p-Dimethylaminoanilin
1,2 l Essigester

Durch Umkristallisieren aus Aethanol oder Dimethylforamid/ Wasser erhält man weiße Kristalle.

Ausbeute: 25 g = 59,7% d.Th.

F. 180,5-181°

N-Carbobenzoxy-D-phenylalanin-p-dimethylaminoanilid

$C_{25}H_{27}N_3O_3$ M = 417,52

Ansatz: 6,0 g N-Carbobenzoxy-D-phenylalanin
2,0 g Triäthylamin
2,16 g Chlorameisensäureäthylester
2,7 g p-Dimethylaminoanilin
100 ml Essigester

Durch Umkristallisieren aus Methanol unter Zusatz von Petroläther erhält man weiße Nadeln.

Ausbeute: 5,5 g = 66,6% d.Th.

F. 186,8° unter Bildung einer roten Schmelze

N-Carbobenzoxy-L-tyrosin-p-dimethylaminoanilid

$C_{25}H_{27}N_3O_4$ M = 433,52

Ansatz: 6,0 g N-Carbobenzoxy-L-tyrosin
2,0 g Triäthylamin
2,16 g Chlorameisensäureäthylester
2,7 g p-Dimethylaminoanilin
150 ml Essigester

Durch Umkristallisieren aus Alkohol bilden sich hellgrüne, verfilzte Nadeln.

Ausbeute: 5,7 g = 60% d.Th.

F. 198,8°

N.N'-Bis-carbobenzoxy-L-cystin-di-(p-dimethylaminoanilid)

$C_{38}H_{44}N_6O_6S_2$ M = 744,95

Ansatz: 25,4 g N.N'-Bis-carbobenzoxycystin
5,0 g Triäthylamin
5,4 g Chlorkohlensäureäthylester
13,6 g p-Dimethylaminoanilin
1,2 l Essigester

Durch Lösen in heißem Dimethylformamid und vorsichtiger Wasserzugabe wurden verfilzte weiße Nadeln erhalten.

Ausbeute: 24 g = 64,5% d.Th.

F. 252° unter Rotfärbung der Schmelze

$[\alpha]_D^{23}$ = -22,4° (c = 1; Dimethylformamid)

N-Carbobenzoxy-DL-norleucin-p-dimethylaminoanilid

$C_{22}H_{29}N_3O_3$ M = 383,50

Ansatz: 5,3 g N-Carbobenzoxy-DL-norleucin
2,0 g Triäthylamin
2,16 g Chlorkohlensäureäthylester
2,7 g p-Dimethylaminoanilin
500 ml Essigester

Die Substanz läßt sich aus Dioxan durch vorsichtige Zugabe von Wasser kristallin erhalten.

Ausbeute: 3,2 g = 41,8% d.Th.

F. 136-137°

N-Carbobenzoxyglutaminsäure-γ-benzylester-α-p-dimethylaminoanilid

$C_{28}H_{31}N_3O_5$ M = 489,58

Ansatz: 7,4 g N-Carbobenzoxyglutaminsäure-γ-benzylester
2,0 g Triäthylamin
2,16 g Chlorkohlensäureäthylester

2,7 g p-Dimethylaminoanilin
200 ml Essigester

Die Substanz kristallisiert aus Alkohol in Form leicht rotgefärbter Nadelbüschel.

Ausbeute: 6 g = 61,8% d.Th.

F. 174° unter Rotfärbung der Schmelze

N-Carbobenzoxyglutaminsäure-γ-methylester-α-p-dimethylaminoanilid

$C_{22}H_{27}N_3O_5$ M = 413,48

Ansatz: 5,9 g N-Carbobenzoxyglutaminsäure-γ-methylester
2,0 g Triäthylamin
2,16 g Chlorkohlensäureäthylester
2,7 g p-Dimethylaminoanilin
200 ml Essigester

Die Substanz fällt zum größten Teil bereits aus der Essigester-Lösung aus und wird durch Umkristallisieren aus Methanol in Form von weißen verfilzten Nadeln erhalten.

Ausbeute: 5 g = 60,5% d.Th.

F. 181° unter Rotfärbung der Schmelze

Aminosäure-p-dimethylaminoanilide

Durch Suspendieren der entsprechenden Carbobenzoxyverbindungen in mit HBr gesättigtem Eisessig (ca. 4 normal) oder mit HCl gesättigter Ameisensäure (ca. 2 normal), schwaches Erwärmen bis zur Lösung und ca. 40 minütiges Stehen (bei HBr/Eisessig) oder 2 tägiges Stehen (bei HCl/Ameisensäure) unter Feuchtigkeitsausschluß, Abdestillieren der Säure im Vakuum bei Temperaturen unter

40° C und Umkristallisieren werden die entsprechenden Dihydrohalogenide der Aminosäure-p-dimethylaminoanilide gewonnen. Die HBr/Eisessig-Lösung wird vor ihrer Verwendung mit etwas Phenol oder Resorcin versetzt, um elementares Brom zu binden. Die Ausbeuten bei der Darstellung der Hydrobromide liegen höher als die der Darstellung der Hydrochloride. Pro Mol Ausgangssubstanz werden 4 Mol Halogenwasserstoffsäure verwendet, wovon 2 Mol zur Salzbildung und 1 Mol zur Bildung des Benzylhalogenids verbraucht werden. Die ungereinigten Substanzen sind außerordentlich hygroskopisch und schließen auch im kristallisierten Zustand Lösungsmittel ein, das erst durch längeres Evakuieren über P_2O_5 bei erhöhter Temperatur entfernt werden kann.

Glycin-p-dimethylaminoanilid:

Dihydrobromid

$C_{10}H_{15}N_3O \cdot 2HBr$ M = 355,10

Ansatz: 6,5 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz wird aus Aethanol und wenig Wasser durch Zusatz von Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 6 g = 84,5% d.Th.

F. 187° (Sintern)

Analyse: ber.: 45,02% Br

gef.: 44,67% Br

Dihydrochlorid

$C_{10}H_{15}N_3O \cdot 2HCl$ M = 266,18

Ansatz: 6,5 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Alkohol und wenig Wasser

durch Zusatz von Aceton in Prismen.

Ausbeute: 3,5 g = 66% d.Th.

F. 245° unter Zersetzung

Analyse: ber.: 26,6% Cl

gef.: 26,3% Cl

Sarkosin-p-dimethylaminoanilid:

Dihydrobromid

$C_{11}H_{17}N_3O \cdot 2HBr$ M = 369,13

Ansatz: 3,4 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Methanol in großen rosafarbenen Nadeln.

Ausbeute: 3 g = 81,4% d.Th.

Sintert ab 240° und zersetzt sich ab 245°

Analyse: ber.: 43,3% Br

gef.: 43,32% Br

DL-Phenylalanin-p-dimethylaminoanilid:

Dihydrobromid

$C_{17}H_{21}N_3O \cdot 2HBr$ M = 445,23

Ansatz: 8,3 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Methanol in Plättchen.

Ausbeute: 8,5 g = 95,5% d.Th.

F. 188°

Analyse: ber.: 35,90% Br

gef.: 35,62% Br

Dihydrochlorid

$C_{17}H_{21}N_3O \cdot 2HCl$ M = 356,31

Ansatz: 8,3 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Methanol in Nadeln.

Ausbeute: 5,5 g = 77,5% d.Th.

F. 252° unter Zersetzung und Rotfärbung

Analyse: ber.: 19,90% Cl

gef.: 20,14% Cl

D-Phenylalanin-p-dimethylaminoanilid:

Dihydrobromid

$C_{17}H_{21}N_3O \cdot 2HBr$ M = 445,23

Ansatz: 1,05 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Aethanol auf Zusatz von Aether sehr langsam in großen Kristallen aus, die leicht rötlich gefärbt sind.

Ausbeute: 0,35 g = 31% d.Th.

F. 231-233° unter Zersetzung

Analyse: ber.: 35,9% Br

gef.: 35,6% Br

L-Tyrosin-p-dimethylaminoanilid:

Dihydrobromid

$C_{17}H_{21}N_3O_2 \cdot 2HBr$ M = 461,23

Ansatz: 2,15 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Alkohol und wenig Wasser auf Zusatz von etwas Aceton in etwas rötlichen Kristallen aus.

Ausbeute: 1,8 g = 78% d.Th.

Zersetzt sich ab 161°

Analyse: ber.: 34,65% Br

gef.: 34,28% Br

Dihydrochlorid

$C_{17}H_{21}N_3O_2 \cdot 2HCl$ M = 372,31

Ansatz: 2,15 g Carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Alkohol auf Zusatz von Aether.

Ausbeute: 1,4 g = 75,5% d.Th.

Zersetzt sich ab 163°

Analyse: ber.: 19,04% Cl

gef.: 19,00% Cl

L-Cystin-di-p-dimethylaminoanilid:

Tetrahydrobromid

$C_{22}H_{32}N_6O_2S_2 \cdot 4HBr$ M = 800,37

Ansatz: 3 g Bis-carbobenzoxy-Verbindung

Die Substanz kristallisiert aus Wasser auf Zusatz von Aceton.

Ausbeute: 3 g = 94% d.Th.

F. 240°

$[\alpha]_D^{23}$ = +35,7° (c = 1; Wasser)

Analyse: ber.: 39,94% Br

gef.: 39,80% Br

Piperidinoessigsäuremethylester

$C_8H_{15}NO_2$ M = 157,22

In Anlehnung an die Vorschrift von E. WEDEKIND (26) wurden 85 g Piperidin und 54 g Chloressigsäuremethylester in 750 ml trockenem Aether 10 Stunden zum Sieden erhitzt. Danach wurde mit Wasser mehrmals durchgeschüttelt. Aus der mit Na_2SO_4 getrockneten organischen Phase wurde der Aether bei Normaldruck abdestilliert. Das zurückbleibende Oel wurde im Vakuum fraktioniert.

$Kp._{20}$ 98-100°; Kp_{760} 207°

Ausbeute: 50 g = 63,5% d.Th.

Piperidinoessigsäurehydrazid

$C_7H_{15}N_3O$ M = 157,22

Durch Erwärmen von 45 g des Methylesters und 15 g Hydrazinhydrat in 75 ml Aethanol, 2 tägiges Stehen und Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum bei 30° C Badtemperatur wird das Hydrazid als Oel gewonnen, das nach längerer Zeit kristallisiert. Es kann aus Petroläther umkristallisiert werden.

Ausbeute: 41 g = 91% d.Th.

F. 52°

Morpholinoessigsäureäthylester

$C_8H_{15}NO_3$ M = 173,22

30 g Chloressigsäureäthylester wurden in 500 ml Benzol zum Sieden erhitzt. Dazu läßt man innerhalb 1 Stunde 44 g Morpholin zutropfen. Nach 5 stündigem Kochen wurde

das Reaktionsprodukt mit Wasser ausgeschüttelt, die organische Lösung getrocknet und das Benzol weitgehendst abdestilliert. Der Rückstand wird im Vakuum fraktioniert.

Ausbeute: 34 g = 78,5% d.Th.

Kp_{20} 105-108°; n_D^{18} = 1,4532

Morpholinoessigsäurehydrochlorid

$C_6H_{11}NO_3 \cdot HCl$ M = 181,63

17,3 g Des Aethylesters werden in 50 ml Aethanol gelöst und mit einer Lösung von 4,5 g NaOH in 10 ml Wasser versetzt. Nach 3 stündigem Stehen wird der Alkohol im Vakuum weitgehend abgezogen, die Lösung mit 20 ml Wasser versetzt und mit konz. HCl angesäuert. Im Vakuum wird bis zur Trockenheit eingedampft und der Kolben im Vakuumexsikkator über P_2O_5 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Durch Auskochen mit Alkohol wird das Hydrochlorid der Säure vom NaCl getrennt und durch Verdampfen des Alkohols wieder isoliert. Die Substanz wird ohne weitere Reinigung zur weiteren Verarbeitung verwendet.

Ausbeute: 17 g = 94% d.Th.

Diphenylaminoessigsäure (N.N-Diphenylglycin) (27)

$C_{14}H_{13}NO_2$ M = 227,26 F. 113°

Carbazoloessigsäureäthylester

$C_{16}H_{15}NO_2$ M = 253,31

In Abänderung der Vorschrift von R. SEKA (28) wurde wie folgt verfahren:

3,9 g Kalium werden in 400 ml trockenem Toluol bis über den Schmelzpunkt erhitzt und dann durch kräftiges Schütteln in Kaliumstaub verwandelt. Unter fortwährendem Schütteln läßt man das Toluol sich auf Zimmertemperatur abkühlen. Dann gibt man 16,7 g Carbazol hinzu und erhitzt unter Rühren auf 80-90° C. Sollte die Reaktion nicht einsetzen, werden vorsichtig einige Tropfen Chloressigsäureäthylester zugegeben. Sobald das Kalium verbraucht ist, werden langsam 12,2 g Chloressigsäureäthylester unter Rühren zugegeben. Nach 1 Stunde läßt man den Kolben Zimmertemperatur annehmen, dekantiert vom Bodensatz ab und zieht das Toluol im Vakuum ab. Der Rückstand wird aus Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: 18,5 g = 73% d.Th.

F. 97°

Carbazoloessigsäurehydrazid

$C_{14}H_{13}N_3O$ M = 239,28

5,6 g des Aethylesters werden in 15 ml Butanol mit 2 ml Hydrazinhydrat 10 Stunden auf 110° C erhitzt. Der entstehende Niederschlag wird gesammelt und aus wenig Alkohol unter Zusatz von Ligroin umkristallisiert.

Ausbeute: 2,9 g = 61% d.Th.

F. 256°

Piperidinoessigsäure-p-dimethylaminoanilid

$C_{15}H_{23}N_3O$ M = 261,38

15,7 g Piperidinoessigsäurehydrazid werden in 100 ml 5 n HCl gelöst. Die Lösung wird im Eis-Kochsalz-Bad gekühlt.

Bei -5° C wird eine konzentrierte wäßrige Lösung von 7 g $NaNO_2$ unter Rühren zugetropft. Nach beendeter Nitritzugabe wird 1 Stunde weitergerührt. Die Lösung wird unter Temperaturkontrolle mit NaOH-Lösung schwach alkalisiert und mehrmals mit Essigester ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigester-Auszüge werden mit verdünnter Sodalösung gewaschen und durch Filtrieren durch ein Faltenfilter von Wasser befreit. Dazu wird eine Lösung von 13,6 g p-Dimethylaminoanilin in Essigester gegeben. Die Lösung färbt sich allmählich dunkel. Nach Stehen über Nacht wird die Essigesterlösung mit Wasser unter Zusatz von Na_2SO_3 gewaschen, dann getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird mehrmals aus Ligroin umkristallisiert. Das reine Produkt kristallisiert in gelben Nadeln.

Ausbeute: 7,5 g = 28,7% d. Th.

F. 101°

Dihydrochlorid

$C_{15}H_{23}N_3O \cdot 2HCl$ M = 334,29

Durch Lösen des p-Dimethylaminoanilids in Aethanol, Zugabe von alkoholischer HCl, Versetzen mit Aether und Umkristallisieren aus Methanol unter Aetherzusatz fällt das Hydrochlorid in weißen, sehr hygroskopischen Nadeln an.

F. 204-206°

Analyse: ber.: 21,21% Cl

gef.: 20,84% Cl

Morpholinoessigsäure-p-dimethylaminoanilid

$C_{14}H_{21}N_3O_2$ M = 263,34

17 g Morpholinoessigsäurehydrochlorid werden unter Zusatz von 20,2 g Triäthylamin in 500 ml Essigester gelöst. Zu der auf -10° C gekühlten Mischung werden 10,8 g Chlorkohlensäureäthylester unter Rühren zugetropft. Nach 1 Stunde folgt die Zugabe von 13,6 g in Essigester gelöstem p-Dimethylaminoanilin. Nach weiterem 2 stündigen Rühren darf die Lösung Zimmertemperatur annehmen und bleibt 12 Stunden stehen. Nach dem Abfiltrieren von Triäthylammoniumchlorid wird der Essigester abdestilliert und der Rückstand aus Ligroin, dann aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert.

Ausbeute: 17 g = 69% d.Th.

F. 119,5°

Dihydrochlorid

$C_{14}H_{21}N_3O_2 \cdot 2HCl$ M = 336,30

Durch Lösen des p-Dimethylaminoanilids in Aethanol, Zugabe von alkoholischer HCl, Versetzen mit Aether und Umkristallisieren aus Methanol unter Aetherzusatz fällt das Hydrochlorid in weißen, sehr hygroskopischen Nadeln an.

F. 168-170°

Analyse: ber.: 21,09% Cl

gef.: 21,42% Cl

Diphenylaminoessigsäure-p-dimethylaminoanilid

$C_{22}H_{23}N_3O$ M = 345,45

2,27 g Diphenylaminoessigsäure werden in 250 ml Essig-

ester gelöst und mit 1 g Triäthylamin versetzt. Zu der auf -10° C gekühlten Lösung werden unter Rühren 1,08 g Chlorkohlensäureäthylester zugetropft. Nach einer Stunde wird die Lösung von 1,36 g p-Dimethylaminoanilin in Essigester zugegeben. Nach weiteren 2 Stunden wird die Lösung aus dem Kältebad genommen und ohne Rühren 12 Stunden stehen gelassen. Mit Wasser wird das Triäthylammoniumchlorid ausgewaschen und der Essigester abdestilliert. Der Rückstand wird aus Ligroin umkristallisiert.

Ausbeute: 2,3 g = 66,6% d.Th.

F. 197-198° unter Rotfärbung der Schmelze

Hydrochlorid

$C_{22}H_{23}N_3O \cdot HCl$ M = 381,91

Beim Zugeben von äthanolischer HCl zu der in Alkohol p-Dimethylaminoanilid-Verbindung fällt nach kurzer Zeit das Hydrochlorid mit 2 Mol Kristallalkohol aus, von dem es durch Trocknen bei 120°/10^{-4} mm Hg befreit wird.

F. 223,5° unter Zersetzung nach Sintern bei 193°

Analyse: ber.: 9,28% Cl

gef.: 9,37% Cl

Carbazoloessigsäure-p-dimethylaminoanilid

$C_{22}H_{21}N_3O$ M = 343,43

2,4 g Carbazoloessigsäurehydrazid werden in 100 ml 5 n HCl gelöst und bei -5° C mit 0,7 g $NaNO_2$ versetzt. Das Azid wird durch Schütteln mit Essigester extrahiert. Die neutral gewaschene Essigesterlösung wird mit 1,36 g p-Dimethylaminoanilin versetzt und die Reaktionslösung

24 Stunden stehen gelassen. Nach dem Waschen mit Wasser wird der Essigester abdestilliert. Der Rückstand wird in Dimethylformamid aufgenommen und langsam mit dem doppelten Volumen Methanol versetzt. Nach 24 stündigem Stehen wird abgesaugt und der Niederschlag mit Methanol gewaschen. Das getrocknete Produkt wird aus Xylol umkristallisiert.

Ausbeute: 3 g = 88% d.Th.

F. 289° unter Zersetzung

Hydrochlorid

$C_{22}H_{21}N_3O \cdot HCl$ M = 379,89

Durch Versetzen des p-Dimethylaminoanilids in Alkohol mit äthanolischer HCl kristallisiert das Hydrochlorid als Diäthanolat. Durch Trocknen bei 120°/10^{-4} mm Hg wird das äthanolfreie Hydrochlorid erhalten.

F. 246° unter Zersetzung nach Sintern bei 240°

Analyse: ber.: 9,33% Cl

gef.: 9,22% Cl

N-Carbobenzoxyglycylglycin-p-dimethylaminoanilid

$C_{20}H_{24}N_4O_4$ M = 384,44

Die Substanz wird nach der Azidmethode (10) dargestellt.

Ansatz: 2,8 g N-Carbobenzoxyglycylglycinhydrazid
0,7 g $NaNO_2$
1,36g p-Dimethylaminoanilin

Ausbeute: 2,5 g = 65,8% d.Th.

F. 174°

N-Carbobenzoxyglycyl-DL-alanin-p-dimethylaminoanilid

$C_{21}H_{26}N_4O_4$ M = 398,47

Die Substanz wird nach der Anhydridmethode (11) dargestellt.

Ansatz: 2,8 g N-Carbobenzoxyglycyl-DL-alanin
1,0 g Triäthylamin
1,08 g Chlorkohlensäureäthylester
1,36 g p-Dimethylaminoanilin

Ausbeute: 2,6 g = 65,4% d.Th.

F. 178-180°

N-Carbobenzoxy-DL-alanylglycin-p-dimethylaminoanilid

$C_{21}H_{26}N_4O_4$ M = 398,47

Die Substanz wird nach der Azidmethode dargestellt.

Ansatz: 2,94 g N-Carbobenzoxy-DL-alanylglycinhydrazid
0,7 g $NaNO_2$
1,36 g p-Dimethylaminoanilin

Ausbeute: 2,5 g = 63% d.Th.

F. 180,5°

N-Carbobenzoxy-DL-alanylalanin-p-dimethylaminoanilid

$C_{22}H_{28}N_4O_4$ M = 412,50

Die Substanz wird nach der Anhydridmethode dargestellt.

Ansatz: 2,94 g N-Carbobenzoxy-DL-alanylalanin
1,0 g Triäthylamin
1,08 g Chlorkohlensäureäthylester
1,36 g p-Dimethylaminoanilin

Ausbeute: 1,8 g = 43,6% d.Th.

F. 240,5°

N-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycin-p-dimethylaminoanilid

$C_{23}H_{29}N_5O_5$ M = 455,52

Die Substanz wird nach der Anhydridmethode dargestllt.

Ansatz: 3,37 g N-Carbobenzoxy-DL-alanylglycylglycin
1,0 g Triäthylamin
1,08 g Chlorkohlensäureäthylester
1,36 g p-Dimethylaminoanilin

Ausbeute: 2,4 g = 52,7% d.Th.

F. 169°

N.N-Diphenylhydrazin (29)

$C_{12}H_{12}N_2$ M = 184,23

N-Carbobenzoxyglycin-[N'.N'-diphenylhydrazid]

$C_{22}H_{21}N_3O_3$ M = 375,43

Die Substanz wird nach der Anhydridmethode dargestellt.

Ansatz: 10,5 g N-Carbobenzoxyglycin
5,0 g Triäthylamin
5,4 g Chlorkohlensäureäthylester
9,2 g N.N-Diphenylhydrazin

Ausbeute: 8,5 g = 45% d.Th.

F. 146°

Aminosäure-N-carbonsäureanhydride

Nach der Methode von A.C. FARTHING und R.J. REYNOLD (17) werden die Aminosäure-N-carbonsäureanhydride (Aminosäure-NCA) hergestellt. Dazu werden die Aminosäuren in absolutem Dioxan suspendiert und bei 40-45° C mit Phosgen behandelt. Die klare, eventuell filtrierte Lösung wird durch Durch-

leiten eines trockenen N_2- oder CO_2-Stromes bei Zimmertemperatur vom größten Teil des überschüssigen Phosgen befreit. Nach dem Abdestillieren des Dioxan im Vakuum erhält man die NCAs als Oele, die nach kurzer Zeit kristallisieren und aus Benzol umkristallisiert werden.

L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA (25)

$C_{13}H_{13}NO_5$ M = 263,24 F. 96-97°

L-Glutaminsäure-γ-methylester-NCA (25)

$C_7H_9NO_5$ M = 187,15 F. 98-99°

DL-Phenylalanin-NCA (17)

$C_{10}H_9NO_3$ M = 191,18 F. 127°

S-Benzylcystein-NCA (30)

$C_{11}H_{11}NO_3S$ M = 237,27 F. 106°

α-Aminopyridin (31)

$C_5H_6N_2$ M = 94,11 F. 57°

Mesoporphyrin-IX-dihydrazid (32)

$C_{34}H_{42}N_8O_2$ M = 594,74

In Abänderung der bekannten Vorschrift wurde der Mesoporphyrindimethylester in n-Butanol mit Hydrazinhydrat auf 110° C bei normalem Druck für 20 Stunden erhitzt. Das Hydrazid fällt in langen Nadeln an.

Mandelsäurehydrazid (33)

$C_8H_{10}N_2O_2$ M = 166,18 F. 132°

Darstellung von Polypeptiden durch Polykondensation von Aminosäure-N-carbonsäureanhydriden

Durch Lösen der Aminosäure-NCAs in organischen Lösungsmitteln und Zugabe der gelösten Initiator-Substanz werden durch 1-2 tägiges Stehen bei 60° C die entsprechenden Polyaminosäuren erhalten. Als Lösungsmittel wird für die Polykondensation von L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA, von L-Glutaminsäure-γ-methylester-NCA sowie zur Mischpolykondensation von L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA mit S-Benzylcystein-NCA Benzol verwendet; das DL-Phenylalanin-NCA wird in Chloroform polymerisiert. Bei der Verwendung von Mesoporphyrin-IX-dihydrazid als Initiator ist Anisol als Lösungsmittel geeignet, da sich das Hydrazid darin ohne Zersetzung löst. p-Dimethylaminoanilin und α-Aminopyridin erweisen sich als sehr gute Initiatoren; die CO_2-Entwicklung setzt sehr heftig ein und kann nach ungefähr 1 Stunde schon nicht mehr wahrgenommen werden. Die entstandenen Polymeren werden mit Ligroin ausgefällt und durch mehrfaches Waschen mit Methanol gereinigt.

Poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester]-p-dimethylaminoanilid

a) Molverhältnis NCA:Initiator = 25:1

Ansatz: 13,2 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
270 mg p-Dimethylaminoanilin
250 ml Benzol

Ausbeute: 9 g = 82% d.Th.

b) Molverhältnis NCA:Initiator = 50:1

Ansatz: 13,2 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
134 mg p-Dimethylaminoanilin
250 ml Benzol

Ausbeute: 9 g = 82% d.Th.

c) Molverhältnis NCA:Initiator = 100:1

Ansatz: 13,2 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
70 mg p-Dimethylaminoanilin
250 ml Benzol

Ausbeute: 8,5 g = 77% d.Th.

Poly-[L-glutaminsäure-γ-methylester]-p-dimethylaminoanilid

Molverhältnis NCA:Initiator = 25:1; 50:1; 100:1

Ansatz: 9,3 g L-Glutaminsäure-γ-methylester-NCA
270 mg; 135 mg; 70 mg p-Dimethylaminoanilin
200 ml Benzol

Ausbeute: ca. 6 g = 84,5% d.Th.

Poly-DL-phenylalanin-p-dimethylaminoanilid

Molverhältnis NCA:Initiator = 25:1; 50:1; 100:1

Ansatz: 9,5 g DL-Phenylalanin-NCA
270 mg; 135 mg; 70 mg p-Dimethylaminoanilin
200 ml Chloroform

Ausbeute: ca. 6,5 g = 88% d.Th.

Poly-S-benzyl-L-cystein-p-dimethylaminoanilid

Molverhältnis NCA:Initiator = 50:1

Ansatz: 11,8 g S-Benzyl-L-cystein-NCA
137 mg p-Dimethylaminoanilin
250 ml Benzol

Ausbeute: 8 g = 83,5% d.Th.

Poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester-S-benzyl-L-cystein]-p-dimethylaminoanilid

Molverhältnis L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA:S-Benzyl-L-cystein-NCA:Initiator = 50:10:1

Ansatz: 13,2 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
2,4 g S-Benzyl-L-cystein-NCA
135 mg p-Dimethylaminoanilin
300 ml Benzol

Ausbeute: 11 g = 85% d.Th.

Poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester]-N'.N'-diphenylhydrazid

Molverhältnis NCA:Initiator = 50:1

Ansatz: 13,2 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
180 mg N.N-Diphenylhydrazin
250 ml Benzol

Ausbeute: 9,5 g = 87% d.Th.

Poly-DL-phenylalanin-N'.N'-diphenylhydrazid

Molverhältnis NCA:Initiator = 50:1

Ansatz: 9,5 g DL-Phenylalanin-NCA
180 mg N.N-Diphenylhydrazin
200 ml Chloroform

Ausbeute: 6,5 g = 88% d.Th.

Poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester]-[pyridyl-(2)]-amid

Molverhältnis NCA:Initiator = 25:1

Ansatz: 13,1 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
188 mg α-Aminopyridin
250 ml Benzol

Ausbeute: 9,5 g = 87% d.Th.

Poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester]-N'-[ß-phenyl-ß-hydroxyacetyl]-hydrazid

Molverhältnis NCA:Initiator = 50:1

Ansatz: 13,1 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
166 mg Mandelsäurehydrazid
250 ml Benzol

Ausbeute: 9 g = 82% d.Th.

Mesoporphyrin-IX-poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester] (34)

Molverhältnis NCA:Initiator = 50:1

Ansatz: 13,1 g L-Glutaminsäure-γ-benzylester-NCA
594 mg Mesoporphyrin-IX-dihydrazid
250 ml Anisol

Ausbeute: 8 g = 73% d.Th.

Mesohämin-IX-poly-[L-glutaminsäure-γ-benzylester]

Zur Ueberführung der Mesoporphyrin-Verbindung in die Mesohämin-Verbindung wird das isolierte und gut mit Methanol gewaschene, aber nicht getrocknete Produkt in Eisessig mit Eisen(II)-acetat in Gegenwart von NaCl behandelt.

Poly-L-glutaminsäure-p-dimethylaminoanilid

a) aus dem Polybenzylester (13)

4,4 g des Polybenzylesters werden in 20 ml mit HBr gesättigtem Eisessig (ca. 4 n) suspendiert und bis zur Lösung erwärmt. Die Lösung wird nach 1 Stunde bei 60° C in Aether eingegossen. Das ausgefallene Produkt wird isoliert und mit Aether gewaschen. Durch Lösen in wäßriger Soda und Ansäuern kann es gereinigt werden. Die Polysäure fällt als weißes Pulver an.

Ausbeute: 2 g = 77,5% d.Th.

b) aus dem Polymethylester (20)

2,8 g des fein gemörserten Polymethylesters werden mit 3 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in 15 ml Wasser und 60 ml 1 n NaOH 3 Stunden gerührt. Die filtrierte Lösung wird angesäuert und die Polysäure abgesaugt und gründlich gewaschen.

Ausbeute: 2,3 g = 89% d.Th.

Mesohämin-IX (35)

$C_{34}H_{36}ClFeN_4O_4$ M = 651,82

Triphenylmethyl (36)

Verwendet wurde eine aus 3 g Triphenylchlormethan und 3 g Zinkstaub in 20 ml Benzol durch Schütteln unter Licht- und Sauerstoffausschluß hergestellte Lösung des Radikals. 1 ml der Lösung enthält ca. $5,4 \cdot 10^{-4}$ Mol.

Triphenyl-^{14}C-methylchlorid

$C_{19}H_{15}Cl$ M = 278,77

989,9 mg Triphenyl-^{14}C-carbinol werden 5 Stunden mit 20 ml Thionylchlorid, das durch fraktionierte Destillation über Bienenwachs rein erhalten worden ist, auf dem Wasserbad am Rückfluß erhitzt. Das Thionylchlorid wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand im Vakuumexsikkator über P_2O_5 getrocknet. Die Kristalle werden zweimal in 0,15 ml Benzol unter Zusatz von 0,01 ml Acetylchlorid in der Hitze gelöst und nach dem Erkalten zur Vervollständigung der Kristallisation mit 0,6 ml Ligroin versetzt. Nach 3 tägigem Stehen im Eisschrank werden die Kristalle abgesaugt und im Vakuum über P_2O_5 und Paraffinschnitzel getrocknet.
Ausbeute: 963,7 mg = 91,5% d.Th.
F. 112°

Triphenyl-^{14}C-methyl

Verwendet wurde eine Lösung des Radikals, die durch Schütteln von 230,2 mg des aktiven Chlorids mit 1 g Zink-

staub in 10 ml Benzol unter Sauerstoffausschluß hergestellt wurde.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität erfolgte durch Zählung der Impulse mit dem Zählrohr FHZ 15b in Verbindung mit dem Meßgerät FH 49 der Firma Frieseke und Höpfner

Der Nullwert des Gerätes betrug 17 Impulse/Minute.
0,5 ml der aktiven Radikallösung gaben nach dem Abdampfen des Benzol 1092 Impulse/Minute.

Wurster'sches Rot (37)

$C_8H_{12}BrN_2$ M = 216,12 F. 146-147°

2.4.6-Tri-tert.-butylphenoxyl (38)

$C_{18}H_{29}O$ M = 261,49 F. 96-98°

N.N-Diphenyl-N'-pikrylhydrazyl (39)

$C_{18}H_{12}N_5O_6$ M = 394,34 F. 137°

Tetraphenylhydrazin (40)

$C_{24}H_{20}N_2$ M = 336,44 F. 144°

Azoisobuttersäuredinitril (41)

$C_8H_{12}N_4$ M = 164,22 F. 100-103°

Literaturverzeichnis

1) R. WILLSTAETTER, Ber.dtsch.chem.Ges. 55, 3606 (1922)

2) H. THEORELL, Biochem.Z. 272, 155 (1934)

3) W. LAUTSCH u. Mitarb., Naturwiss. 38, 210 (1951)

4) W. BROSER u. W. LAUTSCH, Naturwiss. 38, 208 (1951)

5) W. LAUTSCH, W. BIEDERMANN u. W. BROSER, Naturwiss. 38, 478 (1951)

6) W. BROSER u. W. LAUTSCH, Naturwiss. 38, 209 (1951)

7) W. LAUTSCH u. Mitarb., J.Polymer Sci. 8, 191 (1952) Kolloid-Z. 125, 72 (1952)

8) W. LAUTSCH, W. BROSER, W. BIEDERMANN u. H. GNICHTEL, Angew.Chem. 66, 123 (1954)

9) W. LAUTSCH, W. BROSER u. K. BECKER, Z.Elektrochem. 61, 174 (1957)

10) B.F. ERLANGER u. E. BRAND, J.Amer.chem.Soc. 73, 3508 (1951)

11) R.A. BOISSONNAS, Helv.chim.Acta 34, 874 (1951)

12) M. BERGMANN u. L. ZERVAS, Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1192 (1932)

13) D. BEN ISHAI, J.org.Chemistry 19, 62 (1954) s.a. G.W. ANDERSON, J.BLODINGER u. A.D. WELCHER, J.Amer.chem.Soc. 74, 5309 (1952)

14) O. WARBURG u. Mitarb., Biochem.Z. 152, 51 (1924); 164, 481 (1925); 204, 322 (1929); 242, 170 (1931)

15) W. LAUTSCH, Kolloid-Z. 167, 144 (1959)

16) W. LAUTSCH, W. BROSER u. V. GOEDICKE, Z.Naturforsch. 12b, 303 (1957)

17) A.C. FARTHING u. R.I. REYNOLD, Nature (London) 165, 4199 (1950)

18) V. DU VIGNEAUD, H.C. LAWLER u. E.A. POPENOE, J.Amer.chem.Soc. 75, 4880 (1953)

19) V. BRUCKNER u. J. KOVACS, Acta chim.Acad.Sci.hung. 3, 361 (1953)
V. BRUCKNER, J. KOVACS u. K. KOVACS, J.chem.Soc. (London) 19531 145

20) V. BRUCKNER, J. KOVACS, K. KOVACS u. A. KOTAI, Exper. 10, 166 (1954)

21) St. GOLDSCHMIDT u. Mitarb., Ber.dtsch.chem.Ges. 53, 44 (1920); 55, 628 (1922)

22) W. SCHLENK u. Mitarb., Ber.dtsch.chem.Ges. 44, 1182 (1911); 46, 2840 (1913); 47, 473 (1914)

23) C. WURSTER, Ber.dtsch.chem.Ges. 12, 523 (1879)

24) W.F. KUTSCHEROW u. M.I. DOROCHWA, J.allg.Chem. 21, (83), 1486 (1951); ref. in Chemisches Zentralblatt 1952 S. 4599

25) W.E. HANBY, S.G. WALEY u. J. WATSON, J.chem.Soc. (London) 1950, 3244/45

26) E. WEDEKIND, Ber.dtsch.chem.Ges. 35, 182 (1902)

27) R. STOLLE, J.prakt.Chem. 2 90, 274 (1914)

28) R. SEKA, Ber.dtsch.chem.Ges. 57, 1528 (1924)

29) E. FISCHER, Liebigs Ann.Chem. 190, 175 (1878)

30) J. RUDINGER u. F. SORM, Collect.czechoslov.chem.Commun. 16, 214 (1951); ref. in C.A. 46, 6592 (1952)

31) A. TSCHITSCHIBABIN u. O. SEIDE, J.russ.physik.-chem.Ges. 46, 1216 (1914); ref. in C. 1915 I, 1065

32) H. FISCHER u. H. ORTH, "Die Chemie des Pyrrols" II_1, Leipzig 1937 S. 574

33) Th. CURTIUS u. C. MUELLER, Ber.dtsch.chem.Ges., 34, 2796 (1901)

34) W. LAUTSCH u. E. SCHROEDER, Mh.Chem. 88, 432 (1957)

35) H. FISCHER u. H. ORTH, "Die Chemie des Pyrrols" II_1, Leipzig 1937 S. 445

36) M. GOMBERG, Ber.dtsch.chem.Ges. 33, 3150 (1900)

37) R. WILLSTAETTER u. J. PICCARD, Ber.dtsch.chem.Ges. 41, 1469 (1908) s.a.
L. MICHAELIS, M.P. SCHUBERT u. S. GRANICK, J.Amer.chem. Soc. 61, 1981 (1939);
L. MICHAELIS u. S. GRANICK, J.Amer.chem.Soc. 65, 1747 (1943)

38) E. MUELLER u. K. LEY, Chem.Ber. 87, 922 (1954)

39) E. MUELLER, I. MUELLER-RODLOFF u. W. BUNGE, Ber.dtsch. chem.Ges. 55, 628 (1922) s.a.
J.A. LYONS u. W.F. WATSON, J.Polymer.Sci. 18, 141 (1955)

40) H. WIELAND u. St. GAMBARJAN, Ber.dtsch.chem.Ges. 39, 1500 (1906)

41) C.G. OVERBERGER, M.T. O'SHAUGHNESSY u. H. SHALIT, J.Amer.chem.Soc. 71, 2661 (1949)

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Lautsch durchgeführt.

Für die Ueberlassung des Themas sowie für die großzügige Bereitstellung der für die Durchführung der Arbeit benötigten Mittel bin ich Herrn Professor Dr. W. Lautsch zu Dank verpflichtet. Herrn Professor Dr. W. Broser danke ich für die Erörterung theoretischer Probleme.

Lebenslauf

Am 19. Februar 1932 wurde ich als Sohn des Dr. rer.pol. Albert Wissler und seiner Ehefrau Emma, geb. Noe in Berlin-Wilmersdorf geboren. Nach dem vierjährigen Besuch der Volksschule ging ich auf die Dreilinden-Oberschule-Berlin-Wannsee, die ich bis zur Ablegung der Reifeprüfung im Juni 1949 besuchte. Vom Sommersemester 1950 bis zum Herbst 1952 studierte ich an der Universität Würzburg, an der ich im November 1952 mein Dipolm-Vorexamen unter Prof. Dr. F.G. Fischer ablegte. Nachdem ich vom Wintersemester 1952/53 bis zum Wintersemester 1953/54 an der Universität Münster im Organisch-chemischen Institut unter Prof. Dr. F. Micheel meine Ausbildung fortgesetzt hatte, wechselte ich im März 1954 an die Freie Universität Berlin über. Dort führte ich im Institut von Herrn Prof. Dr. W. Lautsch meine Diplom-Arbeit aus und bestand im Mai 1956 meine Diplomprüfung mit "sehr gut".